

双链探针实时荧光 PCR 核酸检测新技术研究

王伟

(麟游县医院检验科 陕西麟游 721599)

摘要:目的:探讨双链探针实时荧光 PCR 核酸检测新技术应用效果。方法:选择 2019 年 5 月-2021 年 4 月核酸检测标本 10 例为对象,采用双链探针与 TaqMan 探针同时测定不同浓度的检测标本;采用实时荧光 PCR 仪完成核酸 Ct 值检测,并对检测结果进行分析;采用双链探针检测代谢酶 CYP2C19*2 不同基因型标本,借助实时荧光 PCR 仪完成核酸 Ct 值检测,确定基因型。结果:双链探针和 TaqMan 探针测定 Ct 值存在明显差异性 ($P<0.05$),且双链探针均能有效检出,Ct 值大小优于 TaqMan 探针,说明双链探针灵敏度更高;仅探针野生链荧光信号强度随着循环次数的增加而增加;建立的多指标双链探针能实现基因点突变检测,其检测结果与 Sanger 测序一致,能区分、确定不同的基因型。结论:双链探针实时荧光 PCR 核酸检测能获得较高的灵敏度,可实现基因型分析,可为临床诊疗提供参考依据。
关键词:双链探针;实时荧光 PCR;核酸检测;新技术;核酸 Ct 值

由于实时荧光定量 PCR 技术具有准确、快速、灵敏等优点,广泛用于登革热、新型冠状病毒等新发传染病的检测^[1]。但是,荧光探针法仅检测目标扩增产物,且该检测方法依赖荧光共振能量转移实现核酸检测^[2]。目前,临床上常用的探针包括:复合探针、TaqMan 探针、分子信标探针等,而 TaqMan 探针使用最为广泛,但是该类探针为单链,背景信号较高,可能会影响其灵敏度。因此,本研究以核酸检测标本为对象,探讨双链探针实时荧光 PCR 核酸检测新技术应用效果,报道如下。

1. 资料与方法

1.1 临床资料

选择 2019 年 5 月-2021 年 4 月核酸检测标本 10 例为对象,男 6 例,女 4 例,年龄 (35-74) 岁,平均 (57.98 ± 5.63) 岁;体重指数 (BMI) (18-31) kg/m²,平均 (23.26 ± 3.51) kg/m²;合并症:高血压 1 例,糖尿病 2 例,冠心病 1 例。

1.2 方法

(1) Qlamp DNA Mini Kit 及 Qiagen,试剂盒购自于德国 Hilden 公司;引物探针,购自于生工生物工程(上海)股份有限公司;(2) 检测方法。采用双链探针与 TaqMan 探针同时测定不同浓度的检测标本,具体方法如下:①双链探针。核酸检测试剂盒购自于宝生物工程(大连)有限公司,包括:10 × Ex Taq Buffer 缓冲液 4 μL、dNTPs 0.2mmol/L, TaKaRa Ex Taq HS 聚合酶 2.5U;上下游引物各 2.4 μL,双探针 1.1 μL,样本模板 30 μL,设定总反应体积为 40 μL。设定反应条件:50℃下 2min、95℃下 5min;94℃下 15s;55℃下 30s,连续完成 45 个循环,退火时采集荧光,采用实时荧光 PCR 仪完成核酸 Ct 值检测,并对检测结果进行分析,见图 1。

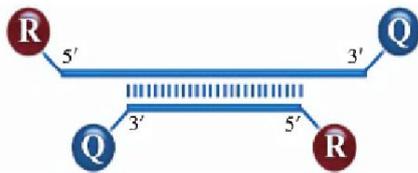


图 1 双链探针示意图

②TaqMan 探针。核酸试剂盒购自于宝生物工程(大连)有限公司,包括:10 × Ex Taq Buffer 缓冲液 4 μL、dNTPs 0.2mmol/L, TaKaRa Ex Taq HS 聚合酶 2.5U;上下游引物各 2.4 μL, TaqMan 探针 1.1 μL,样本模板 30 μL,总反应体积为 40 μL。设定反应条件:50℃下 2min、95℃下 5min;94℃下 15s;55℃下 30s,连续完成 45 个循环,退火时采集荧光;③基因型确定。采用双链探针检测代谢酶 CYP2C19*2 不同基因型标本,借助实时荧光 PCR 仪完成核酸 Ct 值检测,确定基因型^[3]。

1.3 统计分析

采用 SPSS24.0 软件处理,计数资料行 χ^2 检验,采用 n (%) 表示,计量资料行 t 检验,采用 ($\bar{x} \pm S$) 表示, $P<0.05$ 差异有统

计学意义。

2 结果

2.1 不同探针检测 10 份标本核酸样本 CT 值比较

对 10 份标本分别采用双链探针和 TaqMan 探针测定,比较获得的 Ct 值,结果表明:双链探针和 TaqMan 探针测定 Ct 值存在明显差异性 ($P<0.05$),且双链探针均能有效检出,Ct 值大小优于 TaqMan 探针,说明双链探针灵敏度更高,见表 1。

表 1 不同探针检测 10 份标本核酸样本 CT 值比较

样本序号	Ct 值	
	双链探针	TaqMan 探针
1	13.29	16.43
2	13.53	16.61
3	13.96	16.54
4	18.38	22.16
5	18.41	22.61
6	18.38	22.98
7	22.35	25.72
8	21.21	26.09
9	28.48	33.21
10	29.31	35.63

2.2 不同探针基因型分析

对 10 份血液样本完成 Sanger 测序,结果表明:仅探针野生链荧光信号强度随着循环次数的增加而增加;建立的多指标双链探针能实现基因点突变检测,其检测结果与 Sanger 测序一致,能区分、确定不同的基因型,见图 2。

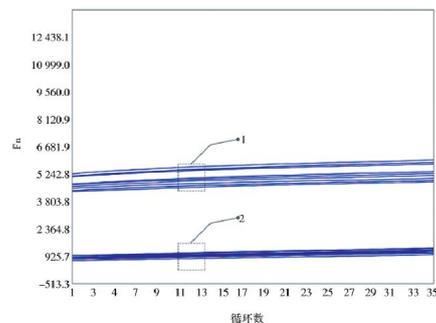


图 2 不同探针荧光本底信号值检测结果

3 讨论

实时荧光 PCR 技术具有准确、灵敏、快速等特点,是检测病原体微生物实验室确认的最佳方法。但是,检测结果受到的影响因素较多,如:病程发展、样本采集时间、样本保存及运输等。而核酸检测试剂的灵敏度仍是影响检测结果的重要因素之一。本研究中,双链探针和 TaqMan 探针测定 Ct 值存在明显差异性 ($P<0.05$),

(下转第 5 页)

(上接第 2 页)

且双链探针均能有效检出, Ct 值大小优于 TaqMan 探针, 说明双链探针灵敏度更高; 仅探针野生链荧光信号强度随着循环次数的增加而增加; 建立的多指标双链探针能实现基因点突变检测, 其检测结果与 Sanger 测序一致, 能区分、确定不同的基因型。从本研究结果看出, 双链探针实时荧光 PCR 核酸检测具有良好的效果, 更适用于低浓度样本核酸的检测, 有助于提高病原体核酸检测的灵敏度, 降低漏检率。

综上所述, 双链探针实时荧光 PCR 核酸检测能获得较高的灵敏度, 可实现基因型分析, 可为临床诊疗提供参考依据。

参考文献:

[1]刘丽艳, 刘琪琦, 张影, 等.双链探针实时荧光 PCR 核酸检测新技术研究[J].中国生物工程杂志, 2020, 40(11):28-34.

[2]沈默, 周武, 梁敏, 等.不同新型冠状病毒核酸检测试剂(荧光 PCR 法)的选择和临床应用[J].浙江医学, 2021, 43(19):2147-2151,2158.

[3]马红霞, 潘静静, 李懿, 等.实时荧光 RT-PCR 方法检测新型冠状病毒核酸结果分析[J].中华微生物学和免疫学杂志, 2020, 40(4):245-249.